

DETECTING METHOD FOR PATHOGEN INFECTION

Patent Number: JP8304397
Publication date: 1996-11-22
Inventor(s): ISHIKAWA EIJI
Applicant(s):: SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD; ISHIKAWA EIJI
Requested Patent: ☐ JP8304397
Application Number: JP19950138446 19950511
Priority Number(s):
IPC Classification: G01N33/543 ; G01N33/569
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To make it possible to conduct sure diagnosis always from an earlier time than the formation of an antibody and also even after the formation of a solid body by using a principle of an immunity complex transition method.

CONSTITUTION: Components, which are respectively peculiarly coupled with at least one antigen of a pathogen and at least one antibody against a different antigen of the same pathogen, are added to the same so as to form an immunity complex containing the antigen to be measured and/or the immunity complex containing the antibody to be measured. The formed immunity complex is captured on first solid phase which is formed by insolubilizing a peculiarly reactive component against a functional group. The immunity complex is separated from the first solid phase, and the immunity complex is captured on second solid phase which is formed by insolubilizing a peculiarly reactive component against a position in the immunity complex different from the functional group so as to measure the captured immunity complex captured on the second solid phase. The formation, the capture, and the measurement of the immunity complex are conducted simultaneously.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-304397

(43) 公開日 平成8年(1996)11月22日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 1 5		G 0 1 N 33/543	5 1 5 A
33/569			33/569	H

審査請求 未請求 請求項の数6 F D (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平7-138446

(22) 出願日 平成7年(1995)5月11日

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(71) 出願人 595080669

石川 榮治

宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1

(72) 発明者 石川 榮治

宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1

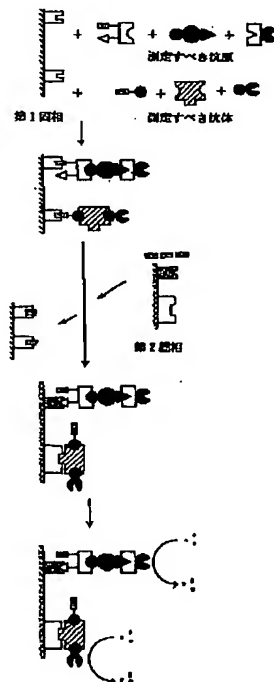
(54) 【発明の名称】 病原体感染の検出方法

(57) 【要約】

【目的】 病原体感染の診断において、抗体が形成されるより早い時期から且つ抗体形成後も常に確実な診断をするためのイムノアッセイを提供する。

【構成】 病原体の少なくとも一つの抗原および同じ病原体の異なる抗原に対する少なくとも一つの抗体をイムノアッセイ法にて同時に測定することによって病原体感染を検出する方法において、測定すべき物質を含む免疫複合体をいったん第1の固相上に形成させた後、この免疫複合体を特異的に第2の固相上へ転移させ、その固相上で測定すべき物質量の測定を行う。

【効果】 既存の抗体測定キットに比べて約2週間早期に検出ができ、さらに既存の抗原測定キットのように感染後日数の経過に伴い測定値が低下するような現象が起きず常時高い信号値が得られる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 「病原体の少なくとも一つの抗原」および「同じ病原体の異なる抗原に対する少なくとも一つの抗体」を同時に測定することによって病原体感染を検出する方法であって、下記の工程（A）、（B）、（C）および（D）からなる、上記方法。

工程（A）：被検液に下記成分（1）、（2）、（3）および（4）を各々少なくとも一つ加えて、測定すべき抗原を含む免疫複合体および／または測定すべき抗体を含む免疫複合体を形成せしめる工程。

（1）官能基で修飾された、病原体の測定すべき抗原に対して特異的に結合する成分

（2）標識された、測定すべき抗原に対して特異的に結合する成分

（3）官能基で修飾された、同じ病原体であるが（1）の測定すべき抗原とは異なる抗原に対する測定すべき抗体に対して特異的に結合する成分

（4）標識された、測定すべき抗体に対して特異的に結合する成分

工程（B）：工程（A）で形成された免疫複合体を、

（1）および（3）における官能基に対して特異的に反応する成分を不溶化した第1固相上に捕捉する工程。

工程（C）：免疫複合体を上記固相から遊離させ、前記官能基とは異なる免疫複合体中の部位に対して特異的に反応する成分を不溶化した第2固相に免疫複合体を捕捉する工程。

工程（D）：第2固相上に捕捉された免疫複合体を測定する工程。

【請求項2】 工程（A）と工程（B）を同時に行うことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 病原体がヒト免疫不全ウイルス-1（HIV-1）である請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 測定すべき抗原がp24であり、測定すべき抗体が抗逆転写酵素（RT）抗体および抗p17抗体であることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項5】 p24抗原、抗逆転写酵素（RT）抗体および抗p17抗体を同時に測定することによってHIV-1感染を検出する方法であって、下記の工程

（A）、（B）および（C）からなる、上記方法。

工程（A）：被検液に下記成分（1）、（2）、（3）および（4）を共に加えて、p24抗原を含む免疫複合体および／または抗逆転写酵素（RT）抗体を含む免疫複合体および／または抗p17抗体を含む免疫複合体を形成せしめる工程。

（1）官能基で修飾された、p24抗原に対して特異的に結合する成分

（2）標識された、p24抗原に対して特異的に結合する成分

（3）官能基で修飾された、抗逆転写酵素（RT）抗体に対して特異的に結合する成分および官能基で修飾され

た、抗p17抗体に対して特異的に結合する成分

（4）標識された、抗逆転写酵素（RT）抗体に対して特異的に結合する成分および標識された、抗p17抗体に対して特異的に結合する成分

工程（B）：工程（A）で形成された免疫複合体を、該官能基に対して特異的に反応する成分を不溶化した固相上に捕捉する工程。

工程（C）：固相上に捕捉された免疫複合体を測定する工程。

【請求項6】 工程（A）と工程（B）を同時に行うことを特徴とする請求項5記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、免疫複合体転移法を用いて特定の病原体の抗原物質および病原体に対して感作された抗体物質を同時に測定することにより、感染症の診断を行うイムノアッセイ法に関する。また、ヒト免疫不全ウイルス-1（HIV-1）のp24抗原、抗p17抗体および抗逆転写酵素（RT）抗体を同時測定することによりHIV-1感染の診断を行うイムノアッセイ法に関する。

【0002】

【従来の技術】抗原物質または抗体物質を測定し分析するための手法として、イムノアッセイ法は、簡便かつ特異性が高いという利点を有する。とりわけ、免疫複合体転移イムノアッセイ（以下、「免疫複合体転移法」という。）は、サンドイッチ法の欠点であった固相への夾雑蛋白の吸着ならびにそれに起因するバックグラウンド信号の発生等を好適に抑制でき、被検体溶液中の抗原物質または抗体物質を、高感度に測定しうる方法として知られている。この免疫複合体転移法は、一対の固相を用いてトラップ（捕捉）を例えば2回行うことを含むイムノアッセイである。次に、免疫複合体転移法により抗原物質あるいは抗体物質を測定する場合の操作手順のそれぞれ1つのパターンを例として概略的に説明する。また、以下、本明細書では説明のために、一対の固相のうち、最初のトラップに用いる固相を第1固相、次のトラップに用いる固相を第2固相という。

【0003】（1）抗原物質測定の場合（図1）

① 測定対象となる抗原（図1の参照番号11、以下同様）に、2種類の異なる官能基で修飾した特異的抗体（12）と標識された特異的抗体（13）とを反応させ、三者よりなる免疫複合体を形成する。

② 上記複合体を、抗体12の一方の官能基に対する受容体を不溶化した第1固相（14）にトラップする。免疫複合体は、被検体溶液中で完成した後にトラップしても、始めに抗体12を固相14上にトラップしておき、その一端に対して完成するものであってもよい。

③ 固相14を洗浄後、免疫複合体を転移させるための転移反応溶液中で、第1固相から免疫複合体を遊離させ

る。

④ 免疫複合体を抗体12の異なる官能基に対する受容体を不溶化した第2固相(15)にトラップする。

⑤ 固相15を洗浄後、免疫複合体の測定対象となる抗原を、①で導入した標識を利用して検出定量する。

【0004】(2)抗体物質測定の場合(図2)

① 測定対象となる抗体(図2の参照番号21、以下同様)に、官能基で修飾した特異的抗原(22)と標識された特異的抗原(23)とを反応させ、三者よりなる免疫複合体を形成する。

② 上記複合体を、抗原22の官能基に対する受容体を不溶化した第1固相(24)にトラップする。免疫複合体は、被検体溶液中で完成した後にトラップしても、始めに抗原22を固相24上にトラップしておき、その一端に対して完成するものであってもよい。

③ 固相24を洗浄後、免疫複合体を転移させるための転移反応溶液中で、第1固相から免疫複合体を遊離させる。

④ 免疫複合体を、前記官能基とは異なる抗体21中の部位に対して特異的に反応する成分を不溶化した第2固相(25)にトラップする。

⑤ 固相25を洗浄後、免疫複合体の測定対象となる抗体を、①で導入した標識を利用して検出定量する。

【0005】免疫複合体転移法に関するさらに詳しい説明、実例については以下の文献に詳細に記載されている。

(1) ISHIKAWA, E., HASHIDA, S., KOHNO, T., (1991): Development of ultrasensitive enzyme immunoassay reviewed with emphasis on factors which limit the sensitivity. MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, 5, 81-95

(2) ISHIKAWA, E., HASHIDA, S., KOHNO, T., et al. (1993): Principle and applications of ultrasensitive enzyme immunoassay (Immune complex transfer enzyme immunoassay) for antibodies in body fluids. J. CLIN. LABORATORY ANALYSIS, 7, 376-393.

(3) 特開平1-254868号 「超高感度抗原物質の測定法」

(4) 特開平2-28558号 「超高感度特異的抗体の測定法」

(5) 石川榮治著(1993) 「超高感度酵素免疫測定法」(学会出版センター)

【0006】上記のように免疫複合体転移法は、抗原あるいは抗体いずれの測定においても従来の技術に比較して高感度に検出可能であり、それゆえ感染症の診断においてより早期かつ高精度に感染の判定が可能である。例えば、抗原の検出に関しては、免疫複合体転移法によるヒト免疫不全ウィルス-1(HIV-1)のp24抗原の検出に関する報告[橋田ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクロバイオリジ(J. Clin. Microbiol.)、第33巻、第298頁(199

5)]、抗体の検出に関しては、同じくHIV-1のp17、p24および逆転写酵素に対する抗体の検出に関する報告[橋田ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス(J. Clin. Lab. Anal.)、第8巻、第237頁(1994)]などがある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】一般に、感染症の免疫学的診断における病原体抗原自身を測定する方法と病原体に対して形成された抗体を測定する方法は、それぞれ特徴を有しているものであり、いずれが好ましいかは検出すべき病原体の種類や検査の目的などによっていずれか一方が選択される。ただし、感染の検出という観点から考えれば、抗体検査の場合、抗体は感染後一定期間以上経たないと形成されてこないもので、感染初期においては、いかなる高感度測定法を用いても検出は難しいという欠点を持っている。一方、抗原検査の場合も、その病原体が生体内で活発に増殖している時期でないと検出されにくいという欠点を持っており、特にヒト免疫不全ウィルスに代表されるように感染後しばらくすると病原体自身が潜在化し無症候化するような場合、その期間の生体液中の抗原検出は、従来のどのような免疫測定法を用いても難しい。

【0008】従って、感染後どの時期においてもより正確に感染の検出を行うためには、高感度の測定方法を用いて抗原と抗体の双方を測定することが重要であるが、既存の技術では、異なる2種類のアッセイを行わなければならない、操作の手間、時間、費用、器具などの問題により実際には、いずれか一方の測定しか行われていない。それゆえ、一回の操作で抗原と抗体を高感度に同時検出し得る測定の開発が望まれていたのである。本発明の目的は、感染症の診断においていずれの時期の被検体においても確実に感染の判定をし得るような、免疫複合体転移法の原理に基づく高感度な抗原と抗体の同時測定の系を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、

[1]「病原体の少なくとも一つの抗原」および「同じ病原体の異なる抗原に対する少なくとも一つの抗体」を同時に測定することによって病原体感染を検出する方法であって、下記の工程(A)、(B)、(C)および(D)からなる、上記方法。

工程(A):被検液に下記成分(1)、(2)、(3)および(4)を各々少なくとも一つ加えて、測定すべき抗原を含む免疫複合体および/または測定すべき抗体を含む免疫複合体を形成せしめる工程。

(1)官能基で修飾された、病原体の測定すべき抗原に対して特異的に結合する成分

(2)標識された、測定すべき抗原に対して特異的に結合する成分

(3) 官能基で修飾された、同じ病原体であるが(1)の測定すべき抗原とは異なる抗原に対する測定すべき抗体に対して特異的に結合する成分

(4) 標識された、測定すべき抗体に対して特異的に結合する成分

工程(B): 工程(A)で形成された免疫複合体を、

(1)および(3)における官能基に対して特異的に反応する成分を不溶化した第1固相上に捕捉する工程。

工程(C): 免疫複合体を上記固相から遊離させ、前記官能基とは異なる免疫複合体中の部位に対して特異的に反応する成分を不溶化した第2固相に免疫複合体を捕捉する工程。

工程(D): 第2固相上に捕捉された免疫複合体を測定する工程。

[2] 工程(A)と工程(B)を同時に行うことを特徴とする上記[1]記載の方法。

[3] 病原体がヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)である上記[1]または[2]記載の方法。

[4] 測定すべき抗原がp24であり、測定すべき抗体が抗逆転写酵素(RT)抗体および抗p17抗体であることを特徴とする上記[3]記載の方法。

に関する。本発明の方法の概略は、図3に示されるものであり、図1の測定法と図2の測定法を組み合わせたものである。

【0010】以下、本発明について工程順に説明する。

工程(A)について

被検液としては、例えば、血清、血漿、唾液、尿、髄液等の生体液および緩衝液が挙げられる。測定すべき病原体としては、細菌、ウイルス、真菌、リケッチア、クラミジア、原虫などが挙げられる。例を挙げれば、結核菌、淋菌、サルモネラ菌、肺炎球菌、肝炎ウイルス、免疫不全ウイルス、T細胞白血病ウイルス、インフルエンザウイルス、マイコプラズマ、梅毒スピロヘータ、カンジダ菌などである。

【0011】ここで言う、病原体の測定すべき抗原に対して特異的に結合する成分とは、通常はその抗原に対して作製された抗体が用いられるが、2者のうちの一方は、例えば抗原と特異的に結合するレクチンや受容体などでもよい。抗体は、完全な抗体の代わりにFab、Fab'またはF(ab')₂のようなフラグメントを用いてもよく、ポリクローナルでもモノクローナルでもよい。また、測定すべき抗体に対して特異的に結合する成分とは、通常はその抗原成分が用いられるが、2者のうちの一方は、例えば、抗抗体などでもよい。この場合各成分の選択には、試薬として用いられる、測定すべき抗原に対して特異的に結合する成分と測定すべき抗体に対して特異的に結合する成分とがそれ自身が反応しないことが最も重要である。測定する抗原あるいは抗体の選択は特に規定されないが、感染をより確実に判定するという目的においては、感染後できるだけ早期に発現する成

分あるいは高い濃度で維持される成分などが選択されることが好ましい。ここでいう官能基としては、ジニトロフェニル基またはトリニトロフェニル基等のハブテンあるいはビオチン等が挙げられる。抗原を測定するための成分に導入される官能基と抗体を測定するための成分に導入される官能基は、同一でも異なっていてかまわないが、特に差し障りがなければ、同一である方が工程(B)の第1固相の作製上好ましい。

【0012】工程(B)について

工程(A)の官能基と特異的に結合する成分としては、例えば、官能基がハブテンであれば抗ハブテン抗体が、ビオチンであれば(ストレプト)アビジンが挙げられる。ただし、官能基と特異的成分の結合は、工程(C)において解離しやすい組合せが好ましい。工程(A)で抗原を測定するための成分に導入される官能基と抗体を測定するための成分に導入される官能基が異なる場合は、それぞれの官能基と特異的に結合する2種類の成分が不溶化されている必要がある。固相としては、従来の免疫学的測定法において使用されているもの全てを使用しうる。例えば、ポリスチレン、ポリアクリル、ガラス、アガロース等が挙げられる。また、形状はどのようなものであってもよい。固相上への上記成分の不溶化法も、従来の免疫学的測定法に用いられるいかなる方法でもよい。固相上に免疫複合体を捕捉後、工程(C)に移行する前に固相を洗浄することが好ましい。洗浄方法は、通常の免疫学的測定法で用いられる方法で行われる。工程(A)、(B)における固相上への免疫複合体の捕捉は、免疫複合体が被検体溶液中で完成した後に固相へ捕捉しても、始めに官能基を有する成分を固相上に捕捉しておき、その一端に対して完成するものであってもよい。また、工程(A)、(B)を同時に行ってもよい。

【0013】工程(C)について

免疫複合体の解離は、複合体を分解させずに行うことが好ましく、例えば、免疫複合体と固相上の成分との結合に関与する官能基と同一部位あるいは類似構造を有する物質を大過剰に加えることで達成される。免疫複合体の第2固相への結合は、固相上に不溶化された、複合体中の前記官能基とは異なる部位に対して特異的に反応する成分を介して行われる。必要であれば、あらかじめ工程(A)で用いられる成分の一つに第2固相への捕捉のための官能基を導入しておいてもよい。測定すべき抗原を含む複合体と測定すべき抗体を含む複合体において異なる部位が捕捉のために使用される場合は、それぞれの部位に特異的な2種類の成分が不溶化されている必要がある。固相上に免疫複合体を捕捉後、工程(D)に移行する前に固相を洗浄することが好ましい。

【0014】工程(D)について

第2の固相上に捕捉された免疫複合体の測定を行うには、あらかじめ工程(A)で導入された標識を用いて行

われる。標識は、従来の免疫学的測定で用いられるもの、例えば、酵素、蛍光物質、放射性物質等が挙げられる。抗原を測定する系で使用される標識と抗体を測定する系で使用される標識は、同一でも異なってもよいが、いわゆる感染の有無を判定するという目的であれば同一である方が操作上好ましい。また、上記工程(A)～(D)の反応は、通常の免疫学的測定に用いられる条件下に行われる。

【0015】さらに本発明は、p24抗原、抗逆転写酵素(RT)抗体および抗p17抗体を同時に測定することによってHIV-1感染を検出する方法であって、下記の工程(A)、(B)および(C)からなる、上記方法に関する。

工程(A):被検液に下記成分(1)、(2)、(3)および(4)を共に加えて、p24抗原を含む免疫複合体および/または抗逆転写酵素(RT)抗体を含む免疫複合体および/または抗p17抗体を含む免疫複合体を形成せしめる工程。

(1)官能基で修飾された、p24抗原に対して特異的に結合する成分

(2)標識された、p24抗原に対して特異的に結合する成分

(3)官能基で修飾された、抗逆転写酵素(RT)抗体に対して特異的に結合する成分および官能基で修飾された、抗p17抗体に対して特異的に結合する成分

(4)標識された、抗逆転写酵素(RT)抗体に対して特異的に結合する成分および標識された、抗p17抗体に対して特異的に結合する成分

工程(B):工程(A)で形成された免疫複合体を、

(1)および(3)における官能基に対して特異的に反応する成分を不溶化した固相上に捕捉する工程。

工程(C):固相上に捕捉された免疫複合体を測定する工程。

工程(A)、(B)における固相上への免疫複合体の捕捉は、免疫複合体が被検体溶液中で完成した後に固相へ捕捉しても、始めに官能基を有する成分を固相上に捕捉しておき、その一端に対して完成するものであってもよい。また、工程(A)、(B)を同時に行ってもよい。測定すべき抗原と抗体として、p24抗原、抗p17抗体および抗RT抗体を選択した場合、免疫複合体転移法を行わなくても転移をする前の段階である第1固相に捕捉した状態で測定を行っても、感染を診断するに十分な効果が得られる。

【0016】【実施例】以下、本発明の有用性を説明するために、実施例として免疫複合体転移法により、ヒト免疫不全ウィルス-1(HIV-1)感染者の陽性転換血清パネルにおけるHIV-1抗原および抗HIV-1抗体同時測定の例を示すが、もとより本発明はこれに限られるものではない。

【0017】実験例1

本実験では、免疫複合体転移法によりHIV-1のp24抗原および抗p17抗体、抗RT抗体の同時検出を行った。各物質の精製・調製の詳細、および実験手順の詳細は次の通りである。

〔各緩衝液〕

緩衝液A:0.1Mリン酸ナトリウム、pH7.0

緩衝液B:0.1Mリン酸ナトリウム、pH6.0、5mMエチレンジアミン四酢酸

緩衝液C:0.01Mリン酸ナトリウム、pH7.0、0.1g/Lウシ血清アルブミン(フラクションV、インターゲン、ニューヨーク)、1mM塩化マグネシウム、1g/Lアジ化ナトリウム

【0018】〔遺伝子組み換えHIV-1抗原〕遺伝子組み換えp17(rp17)、遺伝子組み換えp24(rp24)および遺伝子組み換え逆転写酵素(rRT)は、これら蛋白質をコードするcDNAを含む発現プラスミドを大腸菌に組み込んで発現させた後、塩析やカラムクロマトグラフィー法にて精製を行うことにより調製した。各蛋白質の調製法は、rp17に関しては、〔斉藤ら、マイクロバイオロジー・アンド・イムノロジー(Microbiol. & Immunol.)、第36巻、第105頁(1992)〕および〔橋田ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス(J. Clin. Lab. Anal.)、第7巻、第353頁(1993)〕に、rp24に関しては、〔田中ら、マイクロバイオロジー・アンド・イムノロジー(Microbiol. & Immunol.)、第36巻、第823頁(1992)〕に、rRTに関しては、〔斉藤ら、マイクロバイオロジー・アンド・イムノロジー(Microbiol. & Immunol.)、第34巻、第509頁(1990)〕に記載の公知の方法に従った。

【0019】〔ウサギ抗rp24抗血清の作製〕rp24を0.2mg含む生理食塩水0.5mlをフロイントの完全アジュバンド0.5mlに懸濁し、雌のウサギ(ニュー・ジーランド・アルビノ・ラビット)の皮内に注射した。その後、3週間間隔で3回、rp24を0.2mg含む生理食塩水0.5mlをフロイントの不完全アジュバンド0.5mlに懸濁したものを、同様に注射した。最後の注射から2週間目に採血を行い、抗rp24抗血清を得た。

【0020】〔抗体の精製〕ウサギ抗rp24抗血清およびウサギ抗2,4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン抗血清(シバヤギ、群馬)より塩析とイオン交換クロマトグラフィーを用いる公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ(J. Immunoassay)、第4巻、第209頁(1983)〕にて抗rp24抗体および抗2,4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン抗体をそれぞれ精製した。

【0021】〔チオール基導入蛋白質の調製〕蛋白質へ

のチオール基の導入は、蛋白質のアミノ基を介してN-サクシニミジル-S-アセチルメルカプトアセテート（ペーリンガー・マンハイム、ドイツ）を反応させる公知の方法〔橋田ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス（J. Clin. Lab. Anal.）、第8巻、第86頁（1994）〕にて行った。

【0022】〔マレイミド基導入蛋白質の調製〕蛋白質へのマレイミド基の導入は、蛋白質のアミノ基を介してN-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエート（同仁化学研究所、熊本）を反応させる公知の方法〔橋田ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス、（前出）〕にて行った。

【0023】〔抗体のアフィニティー精製〕

（1）rp24-ウサギ非特異IgGの調製

チオール基を導入したrp24と、マレイミド基を導入したウサギ非特異IgGとを反応させる方法にて調製した。IgG1分子あたりに結合したrp24の平均分子数は、2.5分子であった。

（2）2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンの調製

チオール基を導入したウシ血清アルブミンに、N-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエートを介してε-N-2, 4-ジニトロフェニル-L-リジンを反応させる公知の方法〔橋田ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス（前出）〕により2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンを調製した。ウシ血清アルブミン1分子あたりに結合した2, 4-ジニトロフェニル基の平均の数は6個であった。

（3）蛋白-セファロース4Bの調製

ウサギ非特異IgG-rp24、2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン、およびヒトIgG各々は、ファルマシア（ウプサラ、スウェーデン）の手引書に従ってCNBr-活性化セファロース4Bに不溶化した。

（4）抗rp24抗体（Fab'）₂、抗2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン抗体（IgG）およびウサギ抗ヒトIgGγ鎖抗体（IgG）（医学生物学研究所、名古屋）はそれぞれウサギ非特異IgG-rp24、2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンおよびヒトIgG不溶化セファロース4Bカラムに吸着後、pH2.5で溶出する公知の方法〔河野ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J. Biochem.）、第100巻、第1247頁（1986）〕、〔橋田ら、アナリティカル・レターズ（Anal. Lett.）、第16巻、第31頁（1983）〕によりアフィニティー精製した。

【0024】〔アフィニティー精製抗2, 4-ジニトロフェニル基抗体不溶化ポリスチレンビーズの調製〕着色ポリスチレンビーズ（直径3.2mm、イムノケミカル、岡山）をアフィニティー精製ウサギ抗ジニトロフェ

ニル-ウシ血清アルブミン抗体0.1g/Lを含む緩衝液A中に浸し4℃で一晩静置して物理的吸着により不溶化した。

【0025】〔アフィニティー精製抗ヒトIgGγ鎖抗体およびストレプトアビジン不溶化ポリスチレンビーズの調製〕

（1）ビオチニル-ウシ血清アルブミンの調製

マレイミド基を導入したウシ血清アルブミンにN-ビオチニル-2-メルカプトエチルアミンを反応させる公知の方法〔河野ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス（J. Clin. Lab. Anal.）、第2巻、第19頁（1988）〕にて、ビオチニル-ウシ血清アルブミンを調製した。ウシ血清アルブミン1分子あたりに導入されたビオチンの平均の数は13個であった。

（2）アフィニティー精製抗ヒトIgGγ鎖抗体およびストレプトアビジン不溶化ポリスチレンビーズの調製 白色ポリスチレンビーズ（直径3.2mm、イムノケミカル、岡山）をアフィニティー精製抗ヒトIgGγ鎖抗体0.1g/Lおよびビオチニル-ウシ血清アルブミン0.01g/Lを同時に含む緩衝液A中に浸し4℃で一晩静置して物理的吸着により不溶化した。続いて洗浄後、ストレプトアビジン0.1g/Lを含む緩衝液Aと反応させて調製した。

【0026】〔2, 4-ジニトロフェニル-ビオチニル-ウシ血清アルブミン-アフィニティー精製抗rp24Fab'の調製〕

（1）メルカプトアセチル-2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンの調製

2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンにN-サクシニミジル-S-アセチルメルカプトアセテートを反応させてチオール基を導入した。アルブミン1分子あたりにたチオール基の平均の数は、5.2個であった。

（2）6-マレイミドヘキサノイル-ビオシチンの調製 ビオシチン（シグマ、ミズーリ州、米国）7.5μmolを含む緩衝液A0.45mlとN-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエート5μmolを含むN,N-ジメチルホルムアミド0.05mlを混合し、30℃で30分反応させて、6-マレイミドヘキサノイル-ビオシチンを調製した。

（3）2, 4-ジニトロフェニル-ビオチニル-ウシ血清アルブミンの調製

メルカプトアセチル-2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン6.6mg（0.1μmol）を含む緩衝液B0.1mlと（2）の6-マレイミドヘキサノイル-ビオシチン溶液0.2ml（2μmol）を混合し、30℃で30分反応させた。反応後、N-エチルマレイミド5μmolを含む緩衝液Bを0.05mlを添加し、30℃で15分反応させた。その後、セファデックスG-50（ファイン、ファルマシア）を用い、緩衝

液Aでゲル濾過精製を行った。アルブミン1分子あたり導入されたビオチン分子の平均の数は5.2個だった。

(4) 6-マレイミドヘキサノイル-2,4-ジニトロフェニル-ビオチン-ウシ血清アルブミンの調製
2,4-ジニトロフェニル-ビオチン-ウシ血清アルブミンにN-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエートを用いてマレイミド基を導入した。アルブミン1分子あたりに導入されたマレイミド基の平均の数は3.9個だった。

(5) アフィニティー精製抗 r p 2 4 F a b' の調製
アフィニティー精製抗 r p 2 4 F (a b')₂ を2-メルカプトエチルアミンで還元する公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ (前出)〕にて抗 r p 2 4 F a b' を調製した。

(6) 2,4-ジニトロフェニル-ビオチン-ウシ血清アルブミン-アフィニティー精製抗 r p 2 4 F a b' の調製

アフィニティー精製抗 r p 2 4 F a b' 0.61mg (13nmol) を含む緩衝液B 0.6ml と6-マレイミドヘキサノイル-2,4-ジニトロフェニル-ビオチン-ウシ血清アルブミン 0.17mg (2.6nmol) を含む緩衝液B 0.1ml を混合し、4℃で20時間反応させた。反応後、1μmol の2-メルカプトエチルアミンを含む緩衝液Bを0.01ml 添加し、30℃で15分反応させ、さらに2μmol のN-エチルマレイミドを含む緩衝液Bを0.02ml 添加し、30℃で15分反応させた。続いて反応液をウルトロゲルAcA34 (IBF・バイオテクニクス、フランス) にアプライし、0.1M塩化ナトリウムを含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0を用いて溶出し、ゲル濾過精製を行った。アルブミン1分子あたりに結合した抗 r p 2 4 F a b' の平均の数は2.0分子だった。

【0027】〔β-D-ガラクトシダーゼ-アフィニティー精製抗 r p 2 4 F a b' の調製〕大腸菌由来のβ-D-ガラクトシダーゼ (ペーリンガー・マンハイム、ドイツ) にN, N'-o-フェニレンジマレイミドを用いてマレイミド基を導入し、アフィニティー精製ウサギ抗 r p 2 4 F a b' と反応させる公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ、(前出)〕にて調製した。β-D-ガラクトシダーゼ1分子あたりに結合したアフィニティー精製抗 r p 2 4 F a b' の平均の数は、1.5分子であった。

【0028】〔2,4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-r p 17の調製〕マレイミド基を導入した2,4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンとチオール基を導入した r p 17 を反応させ2,4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-r p 17 を調製した。アルブミン1分子あたりに結合した r p 17 の平均の数は2.8分子であった。

【0029】〔2,4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-r R Tの調製〕マレイミド基を導入した2,4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンとチオール基を導入した r R T を反応させ2,4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-r R T を調製した。アルブミン1分子あたりに結合した r R T の平均の数は1.9分子であった。

【0030】〔β-D-ガラクトシダーゼ-r p 17の調製〕N, N'-o-フェニレンジマレイミドを用いてマレイミド基を導入したβ-D-ガラクトシダーゼとチオール基を導入した r p 17 を反応させβ-D-ガラクトシダーゼ-r p 17 を調製した。β-D-ガラクトシダーゼ1分子あたりに結合した r p 17 の平均の数は2.5分子であった。

【0031】〔β-D-ガラクトシダーゼ-r R Tの調製〕

(1) マレイミド-β-D-ガラクトシダーゼの調製
β-D-ガラクトシダーゼ2.5mg (4.6nmol) を含む緩衝液A 0.19ml に4,4'-ジチオジピリジン (ナカライテスク、京都) 400nmol を含むN, N'-ジメチルホルムアミド0.01ml を添加し、30℃で15分インキュベートした。セファデックスG-50 (ファルマシア) でゲル濾過精製を行った後、N-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエートでマレイミド基を導入した。β-D-ガラクトシダーゼ1分子あたりに導入されたマレイミド基の平均の数は1.5個であった。

(2) β-D-ガラクトシダーゼ-r R Tの調製
マレイミド-β-D-ガラクトシダーゼとチオール基を導入した r R T を反応させてβ-D-ガラクトシダーゼ-r R T を調製した。β-D-ガラクトシダーゼ1分子あたりに結合した r R T の平均の数は1.5個であった。

【0032】〔HIV-1陽性転換血清パネル〕HIV-1陽性転換血清パネルは、ノース・アメリカン・バイオロジカルズ社 (フロリダ州、米国) およびボストン・バイオメディカ社 (マサチューセッツ州、米国) より購入した。

【0033】〔β-D-ガラクトシダーゼの活性測定〕β-D-ガラクトシダーゼの測定は、4-メチルウンベリフェリルガラクトシドを基質とする公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ、(前出)〕で反応させ、生成した4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度を分光蛍光光度計 (RF-510、島津製作所、京都) で測定した。蛍光値は、 1×10^{-8} Mの4-メチルウンベリフェロンの示す蛍光強度を100として補正を行った。

【0034】〔免疫複合体転移法による血清検体中のp24抗原および抗p17抗体、抗R T抗体の同時測定〕
血清検体0.01mlを0.4M塩化ナトリウム、10

0.1 fmolの抗p24 Fab' コンジュゲート(2, 4-ジニトロフェニル-ビオチニル-ウシ血清アルブミン-アフィニティ精製抗p24 Fab' およびβ-D-ガラクトシダーゼ-アフィニティ精製抗p24 Fab'), 30 fmolのrp17, rRTコンジュゲート(2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-rp17, -rRTおよびβ-D-ガラクトシダーゼ-rp17, -rRT), 0.1 mgのウサギ非特異F(ab')₂ および0.05 mgの不活化β-D-ガラクトシダーゼ(ムテイン、ベーリンガー・マイハイム)を含む緩衝液C、0.14 mlと混合した溶液にアフィニティ精製抗2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン抗体不溶化着色ポリスチレンビーズ2個を添加し、室温で一晩インキュベートした。反応後、反応液を除去し、ポリスチレンビーズを0.1 M塩化ナトリウムを含む緩衝液C、2 mlで2回洗浄した。続いて、着色ポリスチレンビーズは0.1 M塩化ナトリウム、1 mM ε-N-2, 4-ジニトロフェニル-L-リジンを含む緩衝液C、0.15 ml中でストレプトアビジンおよびアフィニティ精製抗ヒトIgGγ鎖抗体不溶化白色ポリスチレンビーズとともに室温で3時間インキュベートした。反応後、白色ポリスチレンビーズを前述と同様の方法で洗浄し、結合したβ-D-ガラクトシダーゼの活性を30℃、2.5時間で測定した。結果をカットオフインデックスにより図4、5のDにおよび相対蛍光強度により図6のAに示す。

【0035】比較例1

本比較例では、免疫複合体転移法によりHIV-1のp24抗原の検出を行った。各物質の精製・調製の詳細は下記以外、実験例1と全て同じである。

【ストレプトアビジン不溶化ポリスチレンビーズの調製】白色ポリスチレンビーズ(直径3.2 mm、イムノケミカル、岡山)をビオチニル-ウシ血清アルブミン0.1 g/Lを含む緩衝液A中に浸し4℃で一晩静置して物理的吸着により不溶化した。続いて洗浄後、ストレプトアビジン0.1 g/Lを含む緩衝液Cと反応させて調製した。

【0036】【血清検体におけるp24抗原の測定】血清検体0.01 mlを0.4 M塩化ナトリウム、各々100 fmolの2, 4-ジニトロフェニル-ビオチニル-ウシ血清アルブミン-アフィニティ精製抗p24 Fab' およびβ-D-ガラクトシダーゼ-アフィニティ精製抗p24 Fab'、0.1 mgのウサギ非特異F(ab')₂を含む緩衝液C、0.14 mlと混合した溶液にアフィニティ精製抗2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン抗体不溶化着色ポリスチレンビーズ2個を添加し、室温で4時間インキュベートした。反応後、反応液を除去し、ポリスチレンビーズを0.1 M塩化ナトリウムを含む緩衝液C、2 mlで2回洗浄した。続いて、着色ポリスチレンビーズは0.1 M塩化ナトリウ

ム、1 mM ε-N-2, 4-ジニトロフェニル-L-リジンを含む緩衝液C、0.15 ml中でストレプトアビジン不溶化白色ポリスチレンビーズとともに室温で3時間インキュベートした。反応後、白色ポリスチレンビーズを前述と同様の方法で洗浄し、結合したβ-D-ガラクトシダーゼの活性を30℃、2.5時間で測定した。結果をカットオフインデックスにより図4、5のDに示した。

【0037】比較例2

本比較例では、免疫複合体転移法によりHIV-1の抗p24抗体、抗p17抗体および抗RT抗体それぞれの検出を行った。各物質の精製・調製方法は下記以外、実験例1と全て同じである。なお、それぞれの実験方法については、〔橋田ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・ラボラトリー・アナリシス(J. Clin. Lab. Anal.)、第7巻、第353頁(1993)および第8巻、第86頁(1994)〕、〔橋中ら、ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクロバイオロジー(J. Clin. Microbiol.)、第32巻、第819頁(1994)〕に詳細に記載されている。

【アフィニティ精製抗ヒトIgGγ鎖抗体不溶化ポリスチレンビーズの調製】白色ポリスチレンビーズ(直径3.2 mm、イムノケミカル、岡山)をアフィニティ精製抗ヒトIgGγ鎖抗体0.1 g/Lを含む緩衝液A中に浸し4℃で一晩静置して物理的吸着により不溶化した。

【0038】〔2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-rp24の調製〕マレイミド基を導入した2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンとチオール基を導入したrp24を反応させ2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-rp24を調製した。アルブミン1分子あたりに結合したrp24の平均の数は2.5分子であった。

【0039】〔β-D-ガラクトシダーゼ-rp24の調製〕N, N'-o-フェニレンジマレイミドを用いてマレイミド基を導入したβ-D-ガラクトシダーゼとチオール基を導入したrp24を反応させβ-D-ガラクトシダーゼ-rp24を調製した。β-D-ガラクトシダーゼ1分子あたりに結合したrp24の平均の数は2.1分子であった。

【0040】【血清検体における抗各抗原(p24、p17、RT)抗体の測定】血清検体0.01 mlを0.4 M塩化ナトリウム、100 fmolの各抗原の2, 4-ジニトロフェニルおよびβ-D-ガラクトシダーゼコンジュゲートおよび0.05 mgの不活化β-D-ガラクトシダーゼ(ムテイン、ベーリンガー・マイハイム)を含む緩衝液C、0.14 mlと混合した溶液にアフィニティ精製抗2, 4-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン抗体不溶化着色ポリスチレンビーズ2個を添加し、室温で一晩インキュベートした。反応後、反応液を

除去し、着色ポリスチレンビーズを0.1M塩化ナトリウムを含む緩衝液C、2mlで2回洗浄した。続いて、着色ポリスチレンビーズは0.1M塩化ナトリウム、1mMεN-2, 4-ジニトロフェニル-L-リジンを含む緩衝液C、0.15ml中でアフィニティ精製抗ヒトIgGγ鎖抗体不溶化白色ポリスチレンビーズとともに室温で3時間インキュベートした。反応後、白色ポリスチレンビーズを前述と同様の方法で洗浄し、結合したβ-D-ガラクトシダーゼの活性を30℃、2.5時間で測定した。結果をカットオフインデックスにより図4、5のCに示す。

【0041】比較例3

本比較例では、既存の各種市販HIV-1抗体検出診断キットにより抗体の検出を行った。使用したキットは、「セロディア-HIV」（富士レビオ、東京）、HTLV-III・EIA「アボット」（Abbott Laboratories、イリノイ州、米国）、ウェスタン・プロットキット「HIV-オルソ」（Ortho Diagnostic Systems、ニュー・ジャージー州、米国）の3キットで、測定はいずれもキットの操作手順書に従って行った。各キットの測定値は、「セロディア-HIV」は凝集像を示す最大検体希釈率で、HTLV-III・EIA「アボット」は、カットオフインデックスで、「HIV-オルソ」は各バンドに対する反応の有無（+、-）で表した。結果を図4、5のA、Bに示す。

【0042】実験例2

本実験では、実験例1において複合体転移を行う前のアフィニティ精製抗2, 4-ジニトロフェニル-Uシ血清アルブミン抗体不溶化着色ポリスチレンビーズに捕獲した状態で結合したβ-D-ガラクトシダーゼの活性を測定した。各物質の精製・調製方法は実験例1と全て同じである。結果を図6のBに示す。

【0043】

【発明の効果】上記実験例1、2および比較例1～3によって、以下の3点が確認できた。

（1）免疫複合体転移法による抗原・抗体同時測定の効果

免疫複合体転移法による抗体測定は、既存の抗体測定キットに比べて、約1週間早期に診断可能である。一方免疫複合体転移法による抗原測定は、既存の抗体測定キットより約2週間早期に診断可能であるが、感染後時間が経つに従い測定値が低くなっていく。これに対し、抗原・抗体の同時測定法では、それぞれの検出力が足しあわされて、既存の抗体測定キットによる抗体検出より約2週間前も、抗体検出後も常時高い信号が得られることが

確認できた。

（2）HIV-1感染の早期検出における抗p17抗体測定の有用性

従来抗p17抗体は、それほどよいマーカーとは考えられていなかったが、p17抗原を直接固相に吸着させるのではなく、液相で反応させることになって、HIV-1の感染後、種々の抗原に対する抗体の中で、p17に対する抗体がいち早く高値に出ることがわかり、液相捕捉系での早期検出におけるp17抗体測定の有用性が確認できた。

（3）従来サンドイッチ測定法での効果

p24抗原と抗p17抗体と抗RT抗体の組合せ系においては、必ずしも免疫複合体転移法を行わなくても転移をする前の第1固相に捕捉した状態で測定を行っても十分な効果が得られることが確認できた。

【0044】

【図面の簡単な説明】

【図1】免疫複合体転移法による抗原測定の1パターンの概略図である。

【図2】免疫複合体転移法による抗体測定の1パターンの概略図である。

【図3】免疫複合体転移法による抗原・抗体同時測定法の1パターンの概略図である。

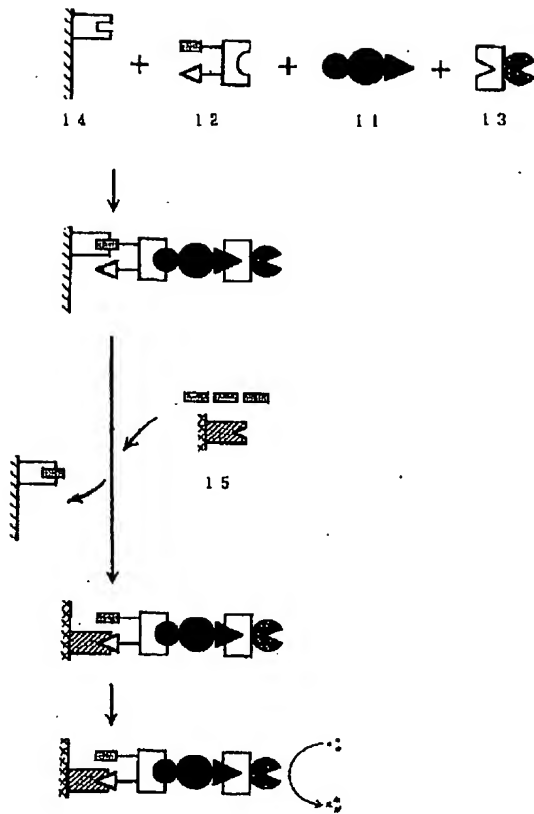
【図4】4種類のHIV-1感染後陽性転換血清パネルを用いて、血液採取開始後一定日数経過後採取検体について、ウェスタンプロットキット（A）、既存の凝集キット（B）、ELISAキット（B）、あるいは免疫複合体転移法によるp24抗原（D）、抗p24抗体

（C）、抗p17抗体（C）、抗RT抗体（C）単独測定の結果と免疫複合体転移法によるp24抗原、抗p17抗体および抗RT抗体の同時測定（D）の結果を比較した図である。横軸は血液採取開始後経過日数、縦軸は各測定法において陰性検体測定より得られたカットオフ値を1としたときの各測定信号値の補正相対値である。ただし、ウェスタンプロットの結果は+、-により、また、凝集法の結果は、凝集を示す最大希釈倍率によりそれぞれ表した。

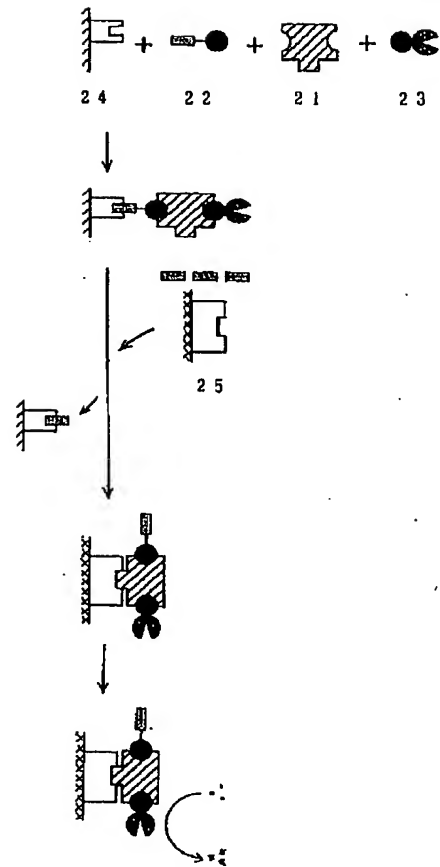
【図5】図4と同様の図である。

【図6】ある血清パネルにおいて、免疫複合体転移法にてp24抗原、抗p17抗体および抗RT抗体の同時測定を行った結果（A）と第1固相に捕捉した段階で測定した結果（B）の比較図である。横軸は図4と同じであり、縦軸は固相に結合したβ-D-ガラクトシダーゼ活性を表す蛍光強度である。点線は、カットオフ値を示す。

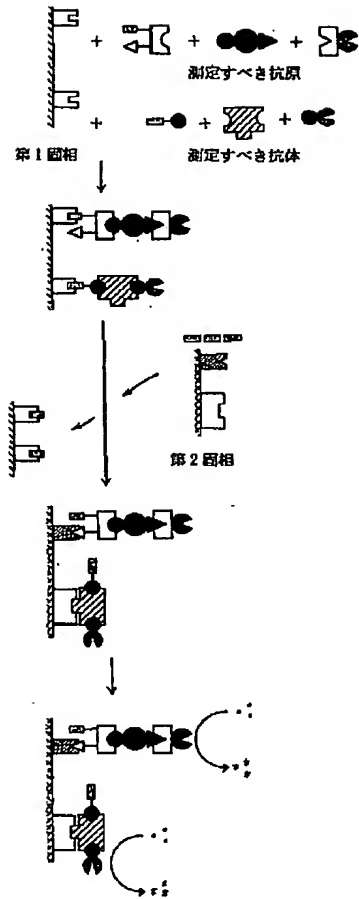
【図1】



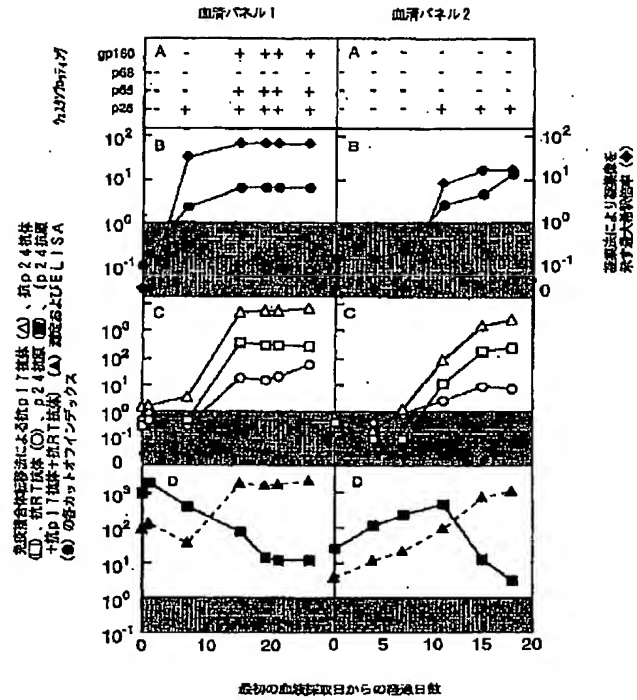
【図2】



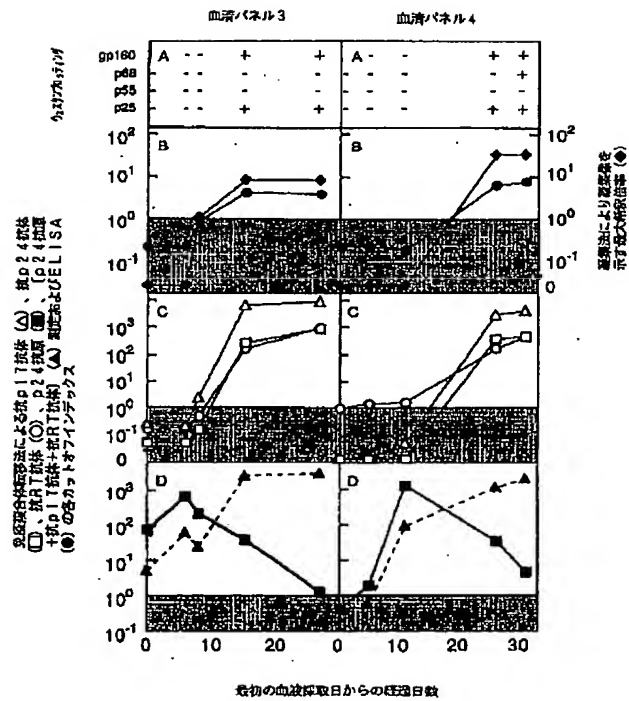
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

